

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Neumannová

Metabolismus adenosinu a jeho úloha v buněčné fyziologii

Adenosine metabolism and its role in cell physiology

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2014

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za ochotu, rady a připomínky při zpracování této práce. Dále děkuji své rodině za podporu a zázemí po celou dobu studia. Nakonec bych chtěla poděkovat svému příteli za psychickou podporu i užitečné rady.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 4. 2014

Podpis

Abstrakt

Adenosin není jen hlavní složkou důležitých molekul jako ATP, RNA nebo cAMP, ale má také vlastní signální funkci. Proto je jeho extracelulární hladina přísně udržována rovnováhou v tvorbě, odbourávání a transportu. Uvnitř i vně buňky vzniká adenosin hlavně cestou degradace ATP a odbouráván je dvěma enzymy, adenosinkinázou a adenosindeaminázou. Přenos adenosinu přes buněčnou membránu zajišťují nukleosidové transportéry, které se podle mechanismu přenosu dělí na ekvilibrační a koncentrační. Všechny tři popsané procesy se podílí na udržování hladiny adenosinu za normálních podmínek a jejím nárůstu za patologických situací. Extracelulární adenosin se jako signální molekula váže na adenosinové receptory (subtyp A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), které prostřednictvím G-proteinů ovlivňují mnoho buněčných signálních drah. Přes tyto dráhy pak adenosin reguluje energetickou homeostázu, projevuje se v regulaci funkce různých orgánů a také v modulaci nervového a imunitního systému, čímž se může účastnit řady patologických procesů. Farmakologické ovlivnění konkrétních adenosinových receptorů nebo enzymů jeho metabolismu může sloužit jako účinná terapie. Některé léky založené na tomto systému už se používají, jiné jsou testovány a řada dalších bude jistě vyvinuta.

Klíčová slova: adenosin, adenosinové receptory, adenosinové transportéry, buněčná signalizace

Abstract

Adenosine is not just a major component of important molecules such as ATP, RNA or cAMP, but also has its own signaling function. Therefore, its extracellular level is strictly maintained by balance in its formation, degradation and transport. Both inside and outside the cell adenosine is formed mainly through degradation of ATP and is eliminated by two enzymes, adenosine kinase and adenosine deaminase. Transport of adenosine through the cell membrane is provided by nucleoside transporters, which are either equilibrative or concentrative according to the mechanism of transfer. All three processes described above contribute to maintaining adenosine level under normal conditions and its increase in pathological situations. Extracellular adenosine as a signal molecule binds to adenosine receptors (subtypes A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) that affect many cellular signaling pathways via G-proteins. By these pathways adenosine regulates energy homeostasis, controls the function of various organs and also modulates the nervous and immune system and thus it may participate in a number of pathological processes. Pharmacological affecting of specific adenosine receptors or enzymes involved in its metabolism can serve as an effective therapy. Some drugs based on this system are already in use, others are being tested, and many more will surely be developed.

Key words: adenosine, adenosine receptors, adenosine transporters, cell signaling

OBSAH

Seznam zkratk	6
1. Úvod	8
2. Metabolismus adenosinu	9
2.1. Tvorba adenosinu	9
2.2. Odbourávání adenosinu	11
3. Přenos adenosinu přes buněčnou membránu	12
3.1. Transportéry ekvilibrační.....	13
3.2. Transportéry koncentrační.....	15
4. Adenosinové receptory	16
5. Buněčné signální dráhy regulované adenosinem	18
6. Fyziologické funkce adenosinu	19
6.1. Energetická homeostáza	20
6.2. Spánková homeostáza.....	21
6.2.1. Energetická hypotéza	22
6.3. Neuromodulace.....	22
6.4. Imunomodulace	23
7. Role adenosinu v patologických procesech	25
7.1. Ischémie.....	25
7.2. Poruchy CNS	26
7.2.1. Parkinsonova choroba	26
7.2.2. Alzheimerova choroba.....	27
7.2.3. Epilepsie.....	28
7.3. Rakovina	28
8. Závěr	29
9. Seznam použité literatury	30

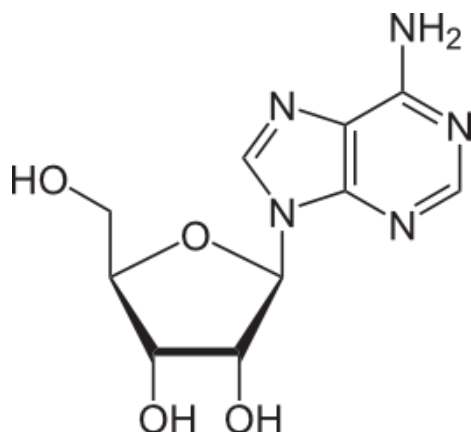
Seznam zkratek

AC	adenylátcykláza
ADA	adenosindeamináza
ADP	adenosindifosfát
AIF	apoptózu indukující faktor
AK	adenosinkináza
AMID	AIF-homologní induktor smrti asociovaný s mitochondrií
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP aktivovaná proteinkináza
APP	amyloidní prekurzorový protein
AR	adenosinový receptor
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD203a	ektonukleotidová fosfodiesteráza 1
CD25	α podjednotka receptoru pro IL-2
CD38	hydroláza cyklické ADP ribózy
CD39	ektonukleosidtrifosfátdifosforyláza 1
CD40L	ligand receptoru CD40
CD73	ekto-5'-nukleotidáza
cN-I	AMP-selektivní cytosolická 5'-nukleotidáza
cN-II	IMP-selektivní cytosolická 5'-nukleotidáza
CNS	centrální nervová soustava
CNT	koncentrační nukleosidový transportér
CTLA-4	antigen cytotoxických T-lymfocytů 1
DAG	diacylglycerol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ENT	ekvilibrační nukleosidový transportér
ENTPD	ektonukleosidtrifosfátdifosforyláza
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GDP	guanosindifosfát

GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
HIF	hypoxií indukovaný faktor
IFN γ	interferon γ
IMP	inosinmonofosfát
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
KW-6002	istradefyllin
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
NBMPR	nitrobenzylthioinosin
NF κ B	jaderný faktor kappa B
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
OAT	organický aniontový transportér
OCT	organický kationtový transportér
PD-1	protein programované buněčné smrti 1
PDE	fosfodiesteráza
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PNP	fosforyláza purinových nukleosidů
RNA	ribonukleová kyselina
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAHH	S-adenosyl-L-homocystein hydroláza
SCID	těžká kombinovaná imunodeficience
TCR	T-buněčný receptor

1. Úvod

Adenosin je purinový nukleosid skládající se z báze adeninu a cukru D-ribózy spojených β -N₉-glykosidickou vazbou (obr. 1). Chemicky je to tedy 6-amino-9-beta-D-ribofuranosyl-9-H-purin.



Obr. 1. Chemická struktura adenosinu (převzato z cs.wikipedia.org)

Adenosin je součástí několika důležitých molekul v buňce, a tak spojuje více mechanismů buněčné regulace. Je základní stavební složkou adenosintrifosfátu (ATP), který je nejen hlavní molekulou energetického metabolismu buňky, ale také extracelulární signální molekulou. Jako nukleosid je adenosin součástí RNA, čímž se podílí na genové expresi. Další důležitou molekulou, jíž je adenosin součástí, je cAMP, který se jako druhý posel účastní intracelulární signalizace.

Vedle toho má však adenosin ještě mnoho dalších fyziologických účinků jako takový. Sám slouží stejně jako ATP jako extracelulární signální molekula, a to prostřednictvím adenosinových receptorů. Zatím známe 4 podtypy – A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃ receptory.

V extracelulárním prostředí může adenosin vznikat z ATP činností membránových enzymů nebo je tvořen v buňce a transportován přes membránu speciálními přenašeči. Tyto nukleosidové transportéry se také podílejí na udržování konstantní hladiny extracelulárního adenosinu za normálních podmínek.

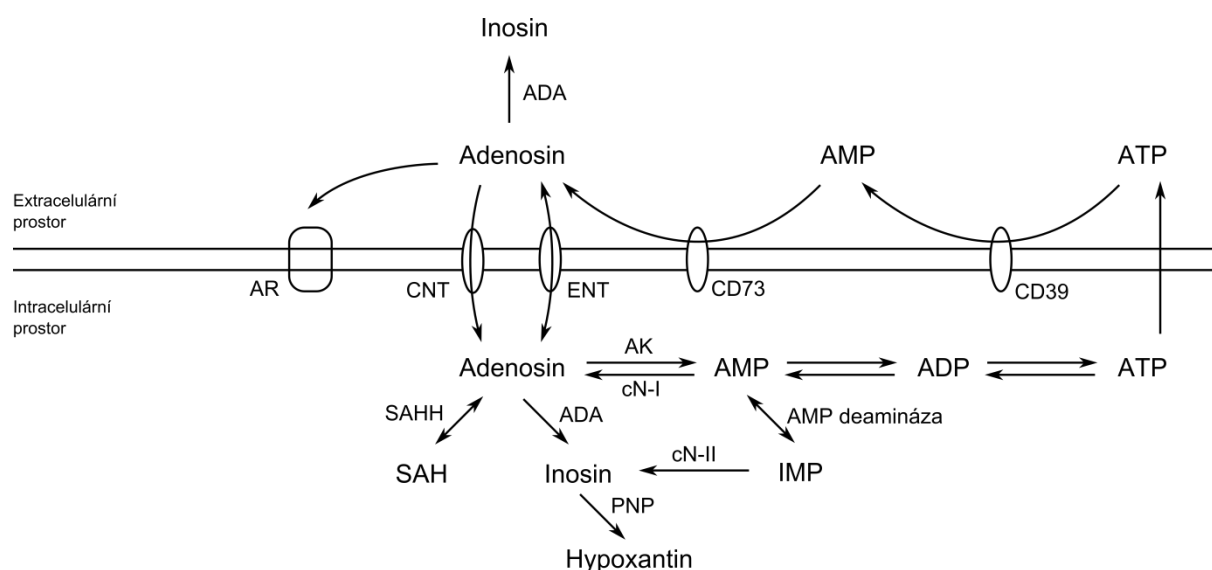
Koncentrace adenosinu stoupá v různých situacích, zejména spojených s nedostatkem kyslíku a energie. Pak adenosin působí snížení energetického nároku buněk a také zvýšení dodávky potřebných metabolitů, neboť jeho působení na buňky hladké svaloviny vede

k vasodilataci. Kromě udržování energetické homeostázy organismu má adenosin řadu funkcí například v nervovém nebo imunitním systému. Tím se účastní regulace mnoha neurodegenerativních i jiných onemocnění.

Cílem této práce je stručně shrnout metabolismus, transport, základní fyziologické funkce adenosinu a nastínit jeho roli ve vybraných patofyziologických procesech.

2. Metabolismus adenosinu

Metabolismus adenosinu zahrnuje jeho tvorbu a odbourávání (obr. 2). Důležitou roli v udržování jeho hladiny mají také molekuly přenášející adenosin přes buněčnou membránu, transportéry ekvilibrační a koncentrační, jimž se věnuje následující kapitola.



Obr. 2. Metabolismus adenosinu. AR – adenosinový receptor, CNT – koncentrační nukleosidový transportér, ENT – ekvilibrační nukleosidový transportér, CD73 – ekto-5'-nukleotidáza, CD39 – ektonukleosidtrifosfátdifosforiláza 1, AMP – adenosinmonofosfát, ADP – adenosindifosfát, ATP – adenosintrifosfát, IMP – inosinmonofosfát, SAH – S-adenosyl-L-homocystein, SAHH – S-adenosyl-L-homocystein hydroláza, AK – adenosinkináza, ADA – adenosindeamináza, cN-I – AMP selektivní cytosolická 5'-nukleotidáza, cN-II – IMP selektivní cytosolická 5'-nukleotidáza, PNP – fosforiláza purinových nukleosidů

2.1. Tvorba adenosinu

Existuje více cest, kterými může adenosin vznikat. Mezi hlavní patří hydrolýza AMP AMP-selektivní cytosolickou 5'-nukleotidázou (cN-I), transmethyle S-adenosyl-L-

homocysteinu (SAH) SAH hydrolázou, hydrolýza AMP alkalickou fosfatázou a extracelulární hydrolýza AMP ekto-5'-nukleotidázou (CD73).

Hlavní způsob tvorby adenosinu v buňce je z ATP. Většina ATP je hydrolyzována na ADP, který může být dále defosforylován na AMP. Následnou defosforylací AMP enzymem 5'-nukleotidáza pak vzniká adenosin. Za normálních podmínek je však většina ADP i AMP znovu fosforylována na ATP oxidační fosforylací v mitochondriích. Pokud je AMP dále odbouráván na inosin a hypoxantin, pak je to převážně přes IMP (obr. 2) a adenosin se tvoří jen minimálně (Barsotti and Ipata, 2004). Ovšem při velké spotřebě ATP a ještě více při nedostatku kyslíku (hypoxii) nedochází dostatečně rychle k refosforylaci ADP a jeho poměr vůči ATP roste. Vysoká koncentrace ADP vede k aktivaci adenylátkinázy (EC 2.7.4.3.) ve směru tvorby ATP a AMP. Tento enzym katalyzuje reakci, při které je fosfát přenesen z jednoho ADP na jiné, ze dvou ADP tedy vzniká ATP a AMP. Celkově tudíž roste také koncentrace AMP, jenž je za těchto podmínek odbouráván převážně adenosinovou cestou (Barsotti and Ipata, 2004). Tím dochází při stresových situacích jako hypoxie k zvýšené tvorbě adenosinu. Ten je poté uvolňován z buňky, kde signalizuje prostřednictvím adenosinových receptorů.

Druhou intracelulární cestou tvorby adenosinu je transmethylace, při které adenosin vzniká hydrolýzou S-adenosyl-L-homocysteinu (SAH) enzymem S-adenosyl-L-homocystein-hydrolázou (EC 3.3.1.1.) (obr. 2). Tato reakce je reverzibilní a její směr závisí na koncentracích adenosinu a homocysteinu (Loncar et al., 1997). In vitro běží reakce ve směru syntézy, ale za fyziologických podmínek jsou adenosin i homocystein rychle metabolizovány, a proto reakce probíhá ve směru hydrolýzy (Suárez and de Sánchez, 1997; Turner et al., 2000).

Do extracelulárního prostoru se adenosin dostává nejen přenosem transportéry přes buněčnou membránu, ale může tam také přímo vznikat. To se děje opět cestou odbourávání ATP. Extracelulární membránový protein CD39 z rodiny ENTPD nejdříve odštěpí z ATP pyrofosfát za vzniku AMP. Ten je poté ekto-5'-nukleotidázou CD73 hydrolyzován na adenosin. Tato cesta přispívá k celkovému extracelulárnímu adenosinu asi z 30 % (Deussen et al., 1993).

Adenosin může vznikat také z cycklického adenosinmonofofátu (cAMP), a to jak intracelulárně, tak extracelulárně. Decyklizaci cAMP na AMP zprostředkovává enzym

fosfodiesteráza (PDE). Následující krok je stejný jako při rozkladu ATP, tedy hydrolýza AMP 5'-nukleotidázou (Brundege et al., 1997).

2.2. Odbourávání adenosinu

Aby byla za normálních podmínek udržena konstantní hladina adenosinu, musí být rovnováha mezi jeho tvorbou a degradací. Existují dvě hlavní cesty odbourávání adenosinu – fosforylace adenosinkinázou (AK) (EC 2.7.1.20) na AMP a deaminace adenosindeaminázou (ADA) (EC 3.5.4.4.) na inosin. Ten může být degradován na hypoxantin a dále až na konečný produkt degradace purinových nukleosidů kyselinu močovou. Vedle toho může být adenosin SAH-hydrolázou spojen s L-homocysteinem za vzniku S-adenosyl-L-homocysteinu (obr. 2).

Jestli bude adenosin preferenčně fosforylován nebo deaminován, závisí jednak na jeho koncentraci a jednak na typu tkáně. Některé tkáně adenosin preferenčně deaminují, jiné ho převážně fosforylují. U většiny však výběr cesty závisí na koncentraci adenosinu (Snyder and Lukey, 1982). Za nízkých koncentrací (pod 3 μM) převažuje fosforylace. Při hladinách vyšších než 5 μM už je adenosin převážně deaminován. Za koncentrací mezi 3 a 5 μM rozhoduje o podílu fosforylace množství volného fosfátu (Hawkins et al., 1980). Fyziologická hladina adenosinu je v řádu nM, a proto je za normálních podmínek převážně fosforylován.

Při nedostatku kyslíku a energie dochází ke zvýšené tvorbě adenosinu. Pak se jeho regulace účastní i ADA (Lloyd, 1995). Za těchto podmínek je ale převážná část adenosinu uvolňována do okolí. To je způsobeno jednak vznikem mnohem většího množství adenosinu, jednak jeho sníženým metabolismem v důsledku inhibice AK hypoxií (Decking et al., 1997). Za normálních podmínek totiž také vzniká poměrně velké množství adenosinu, ale většina (80 %) je ho zpětně refosforylována na AMP adenosinkinázou (Kroll et al., 1993). Při blokaci adenosinkinázy však velká část tohoto adenosinu metabolizována není a může být uvolněna do okolí. To umožňuje amplifikace signálu z malého množství AMP vznikajícího degradací ATP k výraznému zvýšení hladiny adenosinu.

V extracelulárním prostředí se z enzymů degradujících adenosin nachází pouze ADA. Avšak většina adenosinu z tohoto prostředí je transportována do buňky nukleosidovými přenašeči, a tak se jeho regulace účastní i AK (Lloyd, 1995).

3. Přenos adenosinu přes buněčnou membránu

Vzhledem k tomu, že adenosin slouží jako signální molekula, je jeho koncentrace v extracelulárním prostoru přísně regulována. Za normálních podmínek je udržována na konstantní hladině a při stresových situacích naopak rychle roste. Tento nárůst koncentrace adenosinu je zajištěn jeho extracelulární tvorbou, ale také přenosem adenosinu vytvořeného v buňce přes membránu. Naopak pokles jeho koncentrace je umožněn jeho extracelulární degradací i zpětným transportem do buňky (obr. 2).

Adenosin, stejně jako další nukleosidy a nukleobáze, je hydrofilní molekula, a tudíž nemůže volně difundovat přes membránu. V buňkách se vyvinuly specializované transportní systémy k přenosu těchto molekul – nukleosidové transportéry. Ty se dělí do dvou skupin, které se liší způsobem přenosu. Transportéry ekvilibrační (ENT) fungují mechanismem usnadněné difuze a transportéry koncentrační (CNT) využívají symport se sodnými ionty.

Obě proteinové rodiny (ENT, CNT) jsou evolučně velmi staré, ale nejsou příbuzné. Proteiny z rodiny CNT byly nalezeny u eubakterií i eukaryot, nikoliv však v rostlinách. V lidském genomu odpovídá těmto přenašečům rodina SLC28. ENT proteiny byly objeveny u eukaryot, kde jsou velmi rozšířené. U lidí náleží do genové rodiny SLC29 (Young et al., 2013).

Vedle regulace extracelulárního adenosinu mají nukleosidové transportéry i další funkce. Jejich hlavní úlohou je vychytávání nukleosidů a nukleových bází pro syntézu nukleotidů a nukleových kyselin. Je tomu tak proto, že syntéza nukleotidů *de novo* je velmi energeticky náročná a některé buněčné typy jí ani nejsou schopny. Mechanismem založeným na účasti ENT a CNT se také například vstřebávají nukleosidy z potravy. CNT, které se nacházejí především na apikální straně enterocytů, transportují nukleosidy do buňky (Gray et al., 2004). Odtud jsou na bazální straně exportovány ENT přenašeči (Molina-Arcas et al., 2008; Rose and Coe, 2008).

Tyto přenašeče mohou být velmi důležité pro vstřebávání některých analogů nukleosidů využívaných v léčbě rakoviny a virových infekcí. Tyto látky jsou po vstřebání do buňky inkorporovány do DNA/RNA, což vede k ukončení syntézy řetězce a následně k apoptóze (Pastor-Anglada et al., 2008; Zhang et al., 2007). Změny ve struktuře u nukleosidových analogů oproti fyziologickým nukleosidům ovlivňují efektivitu jejich

transportu. Pro přenos se jako nezbytná ukázala především 3'-OH skupina (Pastor-Anglada et al., 2008).

V některých léčebných postupech se také používají inhibitory nukleosidových transportérů. Při zablokování přenosu se zvyšuje hladina extracelulárního adenosinu (Deussen et al., 1999) a tím se prodlužuje jeho pozitivní působení, například při ischemii.

Vedle ENT a CNT existují i další možnosti, jak se nukleosidy a jejich analogy mohou dostávat přes buněčnou membránu. Patří sem například organické kationtové (OCT) a aniontové (OAT) transportéry a proteiny z rodiny ABC. OCT a OAT však transportují pouze analogy nukleosidů nikoliv nukleosidy přirozené. Účastní se především vstřebávání analogů nukleosidů, zatímco ABC pumpy jsou převážně exportní (Koczor et al., 2012).

3.1. Transportéry ekvilibrační

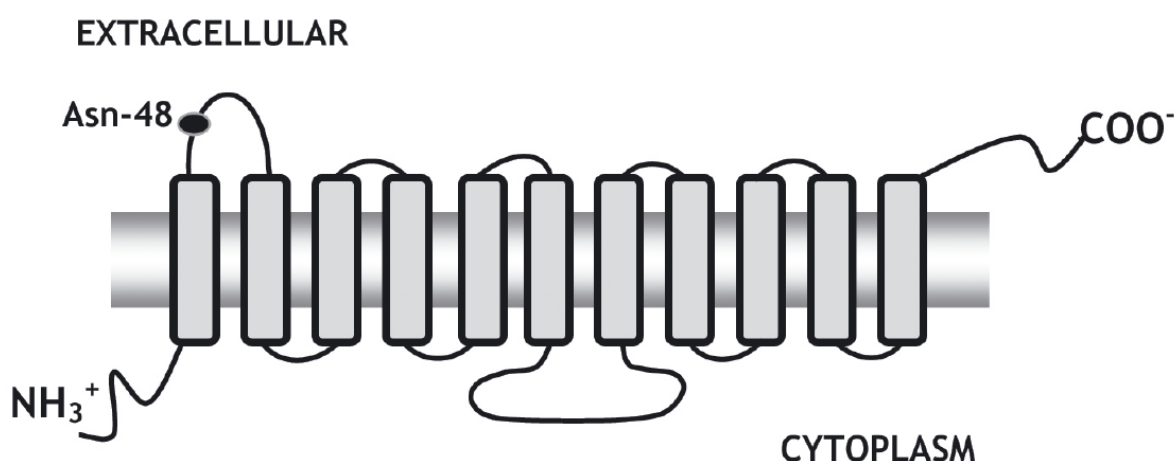
Jak již bylo řečeno, ekvilibrační nukleosidové transportéry využívají usnadněnou difuzi. Proto umožňují přenos adenosinu pouze po jeho koncentračním gradientu, tedy z prostoru s vyšší hladinou adenosinu do prostoru s nižší hladinou. Za normálních podmínek je více adenosinu v extracelulárním prostoru (Deussen et al., 1999), a proto je směr tohoto transportu dovnitř buňky. Za stresových situací, jako je hypoxie nebo zvýšená spotřeba ATP, však dochází k výraznému zvýšení tvorby adenosinu v buňce a směr přenosu se obrací.

Existují dva typy ekvilibračních přenašečů, které se liší svou citlivostí k inhibitoru nitrobenzylthioinosinu (NBMPR), syntetickému analogu nukleosidů. Citlivé přenašeče (*es* – equilibrative senzitive) jsou inhibovány NBMPR už za koncentrací nižších než 1 nM. Necitlivé přenašeče (*ei* – equilibrative insenzitive) jsou inhibovány až koncentracemi okolo 1 μ M. *Es* jsou také citlivější k dalším inhibitorům, jako jsou dilazep, dipyridamol a draflazin (Griffiths et al., 1997; Kiss et al., 2000).

Prozatím byly objeveny 4 proteiny patřící do této skupiny – ENT1-4. Nejdříve objevené a tudíž i nejlépe prozkoumané jsou transportéry ENT1 a ENT2. ENT1 je typický představitel skupiny *es*, je tedy velmi citlivý k NBMPR. Naopak ENT2 je k tomuto i dalším inhibitorům poměrně necitlivý (Griffiths et al., 1997; Wang et al., 2013). I ENT3 je k inhibitorům málo senzitivní (Baldwin et al., 2005). Poslední prozatím objevený přenašeč z této skupiny, ENT4,

je také typem *ei*. NBMPR, dipyridamolem i dilazepem je inhibován pouze velmi slabě (Barnes et al., 2006).

Všechny proteiny z této rodiny jsou tvořeny jedenácti transmembránovými α -helixy. N-konec proteinu je orientován do cytosolu, zatímco C-konec je extracelulárně. Helixy jsou až na dvě výjimky spojeny krátkými peptidovými úseky. Mezi helixem 1 a 2 je delší extracelulární glykosylovaná smyčka a mezi šestým a sedmým helixem se nachází velká intracelulární smyčka (Sundaram et al., 2001).



Obr. 3. Struktura transportéru hENT1 (převzato z (Podgorska et al., 2005))

Jednotlivé přenašeče se liší svou distribucí v tkáních i buňkách. ENT1 i ENT2 jsou velmi rozšířené a nacházejí se téměř ve všech buněčných typech a tkáních (Young et al., 2013). ENT3 je také poměrně četný, ale vyskytuje se převážně uvnitř buňky, a to na lysozomu a v mitochondriích, avšak ne na dalších vnitřních membránách, jako jsou Golgiho aparát nebo endoplazmatické retikulum (Baldwin et al., 2005; Govindarajan et al., 2009). Výskyt ENT4 byl popsán na plazmatických membránách v mozku (Engel et al., 2004) a v srdci (Barnes et al., 2006).

ENT se liší také svou substrátovou specifitou. Všechny ENT transportují adenosin, ale mají různou afinitu k ostatním nukleosidům (Podgorska et al., 2005). ENT1, ENT2 i ENT3 transportují všechny purinové i pyrimidinové nukleosidy. ENT2 a ENT3 navíc transportují i nukleové báze (Yao et al., 2011). ENT4 transportuje hlavně organické kationty, ale také monoaminy (Engel et al., 2004; Young et al., 2013). Z nukleosidů transportuje tento přenašeč pouze adenosin, a to jen za kyselého pH (Barnes et al., 2006; Zhou et al., 2010).

Nejen ENT4, ale i ENT3 fungují jako nukleosidové přenašeče pouze za nízkého pH s optimem okolo 5,5. U ENT3 to není až tak neobvyklé, neboť většina lysozomálních proteinů pracuje za kyselého pH. Může to ovšem také znamenat, že tento protein nevyužívá prostou usnadněnou difuzi, ale kotransport s vodíkovými kationty (Baldwin et al., 2005). ENT4, který se hojně vyskytuje v srdci, pravděpodobně hraje roli v ischemii, kde se uplatňuje v kyselém prostředí (Barnes et al., 2006). Pravděpodobně také používá kotransport s H^+ (Molina-Arcas et al., 2008).

3.2. Transportéry koncentrační

Tato skupina přenašečů využívá na rozdíl od ENT aktivní transport za spotřeby energie. Při přenosu nukleosidů se uplatňuje transmembránový koncentrační gradient sodných iontů, jejichž hladina je výrazně vyšší vně buňky. Protože se v tomto případě jedná o symport, tedy společný transport po koncentračním gradientu, je přenos možný pouze směrem do buňky.

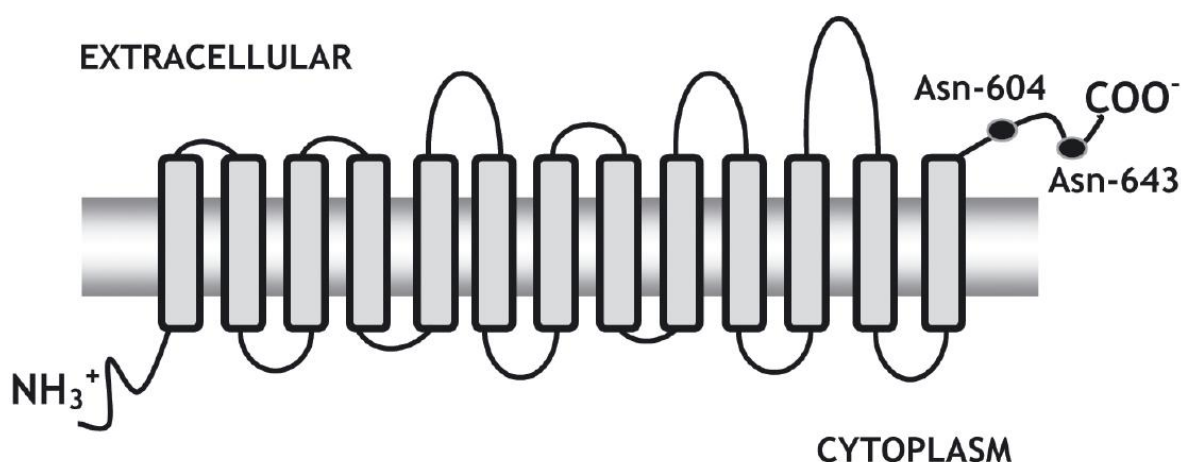
Bylo popsáno šest funkčně rozdílných typů koncentračního nukleosidového transportu, které byly pojmenovány dvěma způsoby. První je založen na numerickém označení (N1-N6), které odpovídá pořadí jejich objevu. Druhý způsob označení (*cif*, *cit*, *cib*, *cit-like*, *cs*, *csg*) vychází ze substrátové specifity (Podgorska et al., 2005).

Dosud byly popsány 3 proteiny náležející do této skupiny – CNT1-3, i když už se objevují i zmínky o CNT4 a CNT5 (Koczor et al., 2012). CNT1 je typem N2 neboli *cit*, což znamená, že transportuje pyrimidinové nukleosidy. Kromě nich se na tento přenašeč váže také s velkou afinitou adenosin, avšak není efektivně přemísťován na druhou stranu membrány (Pastor-Anglada et al., 2008). Tím v podstatě přenašeč blokuje. Substrátovou specifitu *cif* (N1) má transportér CNT2. Přenáší purinové nukleosidy, ale také uridin. CNT3 s *cib* (N3) specifitou přenáší purinové i pyrimidinové nukleosidy (Gray et al., 2004; Young et al., 2013). Proteiny náležící k dalším typům transportu zatím nebyly blíže charakterizovány.

Přenos nukleosidů je u CNT spojen s přenosem sodných kationtů. Mechanismus je takový, že nejdříve se naváže Na^+ , čímž se změní konformace přenašeče a zvýší se jeho afinita k nukleosidu, který se váže následně. Zatímco CNT1 a CNT2 potřebují na přesun jednoho nukleosidu pouze jeden kation Na^+ (Smith et al., 2004, 2007), CNT3 vyžaduje tyto ionty dva. Vedle toho však dokáže vázat i kationty lithia a vodíku. K vodíkovým kationtům má

dokonce vyšší afinitu než k sodným a pro přenos nukleosidu potřebuje pouze jeden proton (Smith et al., 2005).

CNT transportéry jsou tvořeny třinácti transmembránovými α -helixy. Stejně jako u ENT se N-konec proteinu nachází na cytosolické straně membrány a C-konec na straně extracelulární (Hamilton et al., 2001). U C-konce se nacházejí dvě místa pro glykosylaci. Tato modifikace však u CNT, na rozdíl od glykosylace ENT, není nezbytná pro lokalizaci ani funkci těchto transportérů (Pastor-Anglada et al., 2008).



Obr. 4. Struktura transportéru hCNT1 (převzato z (Podgorska et al., 2005))

Koncentrační transportéry nejsou tolik rozšířené jako ekvilibrační, které se nacházejí téměř ve všech tkáních těla. CNT1 se vyskytuje pouze na apikálních membránách epitelálních buněk v tenkém střevě, ledvinách a játrech. CNT2 je rozšířen poněkud více a nachází se také v mozku, srdci, svazech nebo slinivce břišní. Také CNT3 má hojnější výskyt než CNT1, byl objeven v plicích, průdušnici, slinivce břišní a kostní dřeni (Gray et al., 2004). Všechny CNT se vyskytují převážně na plazmatické membráně, i když byly objeveny i formy intracelulární (Errasti-Murugarren et al., 2009).

4. Adenosinové receptory

Signalizace adenosinu je zprostředkována jeho receptory. Dosud byly popsány 4 subtypy adenosinových receptorů A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 . Všechny jsou vzájemně příbuzné a patří do rhodopsinové rodiny (třída A) receptorů spážených s G-proteiny (GPCRs). Receptory této

skupiny mají společnou strukturu sedmi transmembránových α -helixů. N-konec se nachází v extracelulárním prostoru a C-konec v cytosolu.

Receptory byly pojmenovány podle adenosinu, jenž je hlavním agonistou. Vedle něj však s receptory může interagovat například inosin, který je částečným agonistou receptorů A_1 a A_3 (Fredholm et al., 2011a). Receptor A_1 může být také aktivován AMP (Rittiner et al., 2012). Pro signalizaci i výzkum je také důležitá inhibice receptorů prostřednictvím antagonistů adenosinu. Hlavními jsou methylxantiny, mezi něž patří mimo jiné i kofein a theofylin (Fredholm et al., 2001).

Receptory A_1 a A_3 jsou spřaženy s G_i proteiny, takže jejich výslednou funkcí je inhibice adenylátcyklázy. Receptory A_{2A} a A_{2B} signalizují skrze G_s proteiny a adenylátcyklázu naopak stimulují. G_i a G_s však nejsou jediné trimerní G-proteiny přenášející signál od aktivovaných adenosinových receptorů (Kull et al., 2000; Linden et al., 1999).

Jednotlivé receptory se liší svou expresí v tkáních. A_1 receptor je vysoce exprimován hlavně v různých částech mozku, méně pak ve svalech, játrech, ledvinách, tukové tkáni a srdci. Nejvyšší výskyt receptoru A_{2A} je v leukocytech, thymu a krevních destičkách. Nižší výskyt má v srdci, plicích a cévách. Ve velmi rozdílných koncentracích je exprimován v mozku s největším výskytem v corpus striatum. A_{2B} se objevuje nejvíce v tlustém a slepém střevu, ale také v močovém měchýři, plicích, cévách, oku a žírných buňkách. Nejvyšší exprese receptoru A_3 byla nalezena v krysích varlatech a žírných buňkách, menší potom v některých částech mozku (Sachdeva and Gupta, 2013).

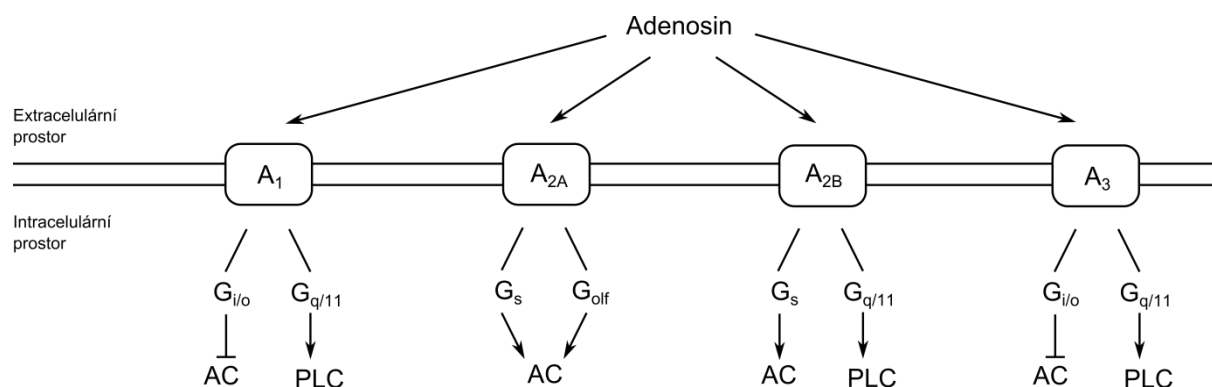
Afinita jednotlivých receptorů pro adenosin se liší, proto jejich aktivace závisí na koncentraci tohoto agonisty v extracelulárním prostředí. Afinita receptorů A_1 a A_{2A} pro adenosin je vysoká, proto mohou být tyto receptory aktivovány i za normálních podmínek. Receptor A_{2B} má afinitu výrazně nižší, takže je aktivován až při zvýšené hladině adenosinu, tedy za stresových situací. Receptor A_3 má sice pro adenosin vysokou afinitu, ale v důsledku jeho velmi řídkého rozmístění je také aktivován až za vyšších koncentrací adenosinu (Fredholm et al., 2001).

Receptory nefungují při přenosu signálu vždy pouze jako monomery, jak se dříve myslelo, ale mohou tvořit oligomery. Nejčastěji jsou to dimery, ať už homodimery nebo heterodimery. Tvorba homodimerů byla popsána u A_1 a A_{2A} receptorů. Tyto receptory spolu

také tvoří heterodimer. A_1 receptory dále interagují s purinergními receptory $P2Y_1$ a $P2Y_2$ nebo například s dopaminovým receptorem D_1 . A_{2A} receptory zase ovlivňují dopaminové receptory D_2 a D_3 , kanabinoidní receptory CB_1 nebo metabotropní glutamátový receptor $mGlu_5$ (Fredholm et al., 2011a).

5. Buněčné signální dráhy regulované adenosinem

Vazba ligandu (adenosinu) na receptor způsobí jeho konformační změnu, a tím aktivaci G-proteinu výměnou GDP za GTP. To vede k jeho rozdělení na α podjednotku s navázaným GTP a komplex podjednotek $\beta\gamma$. Obě tyto části G-proteinu pak mohou dále ovlivňovat aktivitu různých enzymů nebo iontových kanálů. Aktivace těchto efektorových molekul vede ke zvýšené nebo naopak snížené produkci druhých posílů a/nebo ke změně membránového potenciálu.



Obr. 5. Hlavní dráhy signalizace adenosinových receptorů. AC – adenylátcykláza, PLC – fosfolipáza C

Pro všechny adenosinové receptory je typická interakce s G-proteiny, které ovlivňují činnost adenylátcyklázy (AC) a tím koncentraci cAMP v buňce. Receptory A_1 a A_3 aktivují $G_{i/o}$ proteiny a AC tak inhibují, což vede k poklesu hladiny cAMP. A_{2A} a A_{2B} receptory naopak AC aktivují prostřednictvím G_s proteinů, případně G_{olf} v případě A_{2A} nervové soustavy (Corvol et al., 2001; Kull et al., 2000). Avšak i z tohoto pravidla existují výjimky. Za určitých podmínek může i A_1 receptor interagovat s proteiny třídy G_s a AC stimulovat (Baker, 2005; Cordeaux et al., 2004).

Další důležitý enzym, na jehož aktivaci se adenosinové receptory podílejí, je fosfolipáza C (PLC). Prostřednictvím G-proteinu $G_{q/11}$ ji aktivují receptory A_1 , A_{2B} a A_3 . PLC následně štěpí fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP_3 se váže na kanály pro vápenaté ionty na endoplasmatickém retikulu a tím je otevírá. Způsobí tedy nárůst cytoplasmatického Ca^{2+} , který funguje jako třetí posel. DAG společně s Ca^{2+} aktivují enzym proteinkinázu C (PKC), který dále fosforyluje cílové proteiny (Boison et al., 2010; Headrick et al., 2013).

G_i protein asociovaný a receptory A_1 a A_3 působí vedle inhibice adenylátcyklázy ještě na další proteiny. Způsobuje inhibici napěťově závislých kanálů pro vápenaté ionty a tím i pokles Ca^{2+} . Kanály pro draselné kationty naopak aktivuje. Komplex $G\beta\gamma$ podjednotek aktivuje PI3 kinázu, která fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP3) (Boison et al., 2010; Headrick et al., 2013; Krieg et al., 2002).

Dalšími proteiny, na jejichž aktivaci se adenosinové receptory podílí, jsou mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK). Ty jsou stimulovány proteinkinázou A, která je aktivována zvýšenou hladinou cAMP, tedy přes receptory A_{2A} a A_{2B} . Prostřednictvím A_1 a A_3 jsou MAPK také aktivovány, a to přes PI3 kinázu. MAP kinázy tvoří kaskádu enzymů, které se postupně fosforylují a tím aktivují. Posledním krokem bývá aktivace některého transkripčního faktoru. Touto cestou se adenosin podílí na regulaci buněčné proliferace a diferenciaci (Schulte and Fredholm, 2003).

Přestože adenosinové receptory náleží do rodiny GPCRs, neovlivňují buněčnou signalizaci pouze prostřednictvím G-proteinů. Další možností je přímá interakce s jinými receptory. S purinergními nebo dopaminergními receptory tvoří oligomery a tím přímo ovlivňují jejich signalizaci. Vzájemné působení adenosinových receptorů s glutamátovými receptory NMDA, $GABA_A$ receptorem a ATP-senzitivními K^+ kanály se uplatňuje především v neuromodulaci (Sichardt and Nieber, 2007).

6. Fyziologické funkce adenosinu

Prostřednictvím signálních drah působí adenosin na mnoho buněčných procesů a tím ovlivňuje různé fyziologické procesy v organismu. V důsledku protichůdného působení jednotlivých adenosinových receptorů mohou být výsledky jeho působení opačné. Většinou

však buď v daném buněčném typu převládá jeden typ receptorů, nebo je přednostně vybírána jedna odpověď. Volba určité odpovědi může být také ovlivněna konkrétními podmínkami, například koncentrací adenosinu.

6.1. Energetická homeostáza

Jako přímý produkt degradace ATP je adenosin ideální molekula k regulaci energetického metabolismu buňky. Při zvýšené energetické spotřebě klesá hladina ATP a zároveň roste hladina AMP, jak je popsáno v kapitole o metabolismu adenosinu. AMP samotné signalizuje nedostatek energie v buňce přes AMP aktivovanou proteinkinázu (AMPK), která slouží jako metabolický senzor buňky. Při zvýšené hladině AMP je AMPK aktivována a následně fosforyluje enzymy účastnící se v metabolických drahách buňky. Tím inhibuje anabolické a aktivuje katabolické procesy.

Při stresových situacích je ale třeba předávat tuto informaci i okolním buňkám. K tomuto účelu ale AMP sloužit nemůže, protože nedokáže procházet buněčnou membránou. V tomto případě je využit produkt hydrolýzy AMP adenosin. V bodě defosforylace AMP také dochází k další amplifikaci signálu. Za normálních okolností totiž dochází k velkému obratu mezi AMP a adenosinem a až 80 % vzniklého adenosinu je zpět refosforylováno adenosinkinázou (AK). Za hypoxie však dojde k inhibici AK a hladina adenosinu tak rychle roste. Společně s ekvilibračními transportéry pak malé změny v intracelulární koncentraci ATP vedou k mnohonásobně větším změnám v koncentraci extracelulárního adenosinu (Decking et al., 1997; Kroll et al., 1993).

Adenosin může také vznikat přímo extracelulárně při uvolnění ATP z buňky. Větší množství ATP se do extracelulárního prostředí dostává především v patologických situacích, jako je nekróza nebo porušení buněčné membrány. Dále bylo ukázáno, že stimulem pro uvolnění ATP může být také například nízké pH (Gourine et al., 2010; Tu et al., 2010) nebo hypoxie (Erllichman et al., 2010). ATP je pak degradováno až na adenosin membránovými enzymy CD39 a CD73 (obr. 2).

První cesta, kterou adenosin reguluje energetický metabolismus buňky, je bez zapojení adenosinových receptorů. Extracelulární adenosin je transportován do buňky a tam fosforylován. Vzniklý AMP pak aktivuje AMPK a tím ovlivňuje metabolismus (Aymerich et al., 2006).

V druhém případě působí adenosin prostřednictvím svých receptorů. Aktivace A_1 a A_3 receptoru způsobí zpomalení metabolismu a tak snižuje energetickou spotřebu buňky (Maldonado et al., 2013). Ovlivnění konkrétních metabolických drah se liší v závislosti na buněčném typu. V adipocytech je to inhibice lipolýzy, ve svalech inhibice glykolýzy a v tukové tkáni i ve svalech se zvyšuje absorpce glukózy.

Adenosin působí na metabolismus nejen na buněčné úrovni, ale také na úrovni celého organismu. Podílí se na metabolismu glukózy a lipidů, při nedostatku kyslíku zvyšuje rychlost dýchání a zásobení tkání krví. V mozku ovlivňuje centra, která se podílí na řízení příjmu potravy, spánku i tělesné teploty (Fredholm et al., 2011b).

Přestože se v tukové tkáni nachází všechny typy adenosinových receptorů, na inhibici lipolýzy se podílí pouze A_1 . Jím zprostředkovaná inhibice adenylátcyklázy vede ke snížení hladiny cAMP a tím snížení aktivity lipáz, tedy k inhibici lipolýzy. Opačný efekt má adenosin na lipogenezi, kterou stimuluje. V metabolismu tuků tedy působí adenosin stejně jako insulin a jejich účinek se sčítá (Johansson et al., 2008).

Glukózové homeostázy je docíleno rovnováhou mezi příjmem glukózy ve stravě, jejím uvolňováním z jater a spotřebou ve svalech a tukové tkáni. Tyto procesy jsou přesně regulovány hormony insulinem a glukagonem. A právě ovlivněním těchto hormonů se na metabolismu glukózy podílí i adenosin. Uvolňování glukagonu α -buňkami slinivky břišní stimuluje (Petrack et al., 1981). Sekreci insulinu za normálních podmínek inhibuje (Hillaire-Buys et al., 1987) a to prostřednictvím A_1 receptorů (Zywert et al., 2011). Při mimořádně vysokých koncentracích adenosinu (mM) je ale sekrece insulinu naopak zvýšená (Koupenova and Ravid, 2013). Takto vysoké koncentrace se však v organismu normálně nevyskytují.

6.2. Spánková homeostáza

Spánková homeostáza znamená, že po prodloužené době bdělosti následuje prodloužený spánek (zotavující spánek). Samotný spánek má dvě hlavní fáze REM (rapid eye movement) a NREM (non-rapid eye movement), které se cyklicky střídají.

Existuje více teorií, které vysvětlují udržování spánkové homeostázy. Energetická hypotéza patří do skupiny teorií založených na energetickém metabolismu. To jsou teorie,

kteřé tvrdí, že spánek je nutný k obnovení energetických zdrojů těla. Právě v této teorii figuruje adenosin, a proto je popsána dále.

Další teorie jsou spojené s neurální plasticitou nebo s funkcí imunitního systému. Do první skupiny patří například teorie synaptické homeostázy. Další teorie zahrnuje imunitní systém, který je aktivován při prodlouženém bdění. To vede k mnoha změnám, mimo jiné i zvýšené produkci cytokinů, které regulují spánek. Určitě tedy hrají roli v zotavujícím spánku, ale jejich role v normálním spánkovém cyklu zatím nebyla prokázána.

6.2.1. Energetická hypotéza

Při bdění dochází v důsledku neuronální aktivity ke spotřebě energie, tedy k hydrolýze ATP. To vede ke zvýšení hladiny adenosinu, který snižuje aktivitu neuronů a tím indukuje spánek. Hladina adenosinu je tedy vyšší při bdění a klesá při spánku. Nejvíce hladina adenosinu stoupá při prodlouženém bdění, ale pouze v bazální oblasti předního mozku, kde působí na cholinergní buňky. To vede k navození zotavujícího spánku (Porkka-Heiskanen et al., 2000).

Adenosin tlumí aktivitu neuronů hlavně skrze adenosinový receptor A_1 . Při zablokování tohoto receptoru proto nedojde ke spánku (Gass et al., 2009). Možnou roli má ale také receptor A_{2A} . Prostřednictvím tohoto receptoru také pravděpodobně účinkuje hlavní antagonist adenosinu kofein, který tímto působí proti spánku (Huang et al., 2005).

Podobné účinky jako adenosin má i oxid dusnatý (NO). Jeho hladina roste ještě před zvýšením koncentrace adenosinu, což přispívá k teorii, že se na uvolňování adenosinu podílí (Kalinchuk et al., 2011). Zatím ale není jasné jakým mechanismem. Produkce NO byla ukázána jako nezbytná pro indukci zotavujícího spánku (Kalinchuk et al., 2006).

6.3. Neuromodulace

V nervové soustavě není adenosin klasickým neurotransmiterem, neboť není uvolňován exocytózou ze synaptických vezikulů a také nepůsobí výhradně na synapsích, ale slouží jako neuromodulátor. Neurální aktivitu ovlivňuje více mechanismy: presynapticky kontroluje vylití neurotransmiteru, postsynapticky hyperpolarizuje nebo depolarizuje membránu neuronů, ale také ovlivňuje činnost gliových buněk.

Nejvíce exprimovaným receptorem v CNS je A_1 . Dalším poměrně častým typem je receptor A_{2A} , který se nachází hlavně ve striatu. Receptory A_{2B} a A_3 se v mozku vyskytují pouze v malém množství a převážně v astrocytech (Dixon et al., 1996).

Receptor A_1 působí na synaptický přenos inhibičně. Presynapticky zabraňuje vylití neurotransmiterů jako dopamin, glutamát, serotonin a acetylcholin. Postsynapticky způsobuje hyperpolarizaci inhibicí napěťově závislých Ca^{2+} kanálů a otevřením K^+ a Cl^- kanálů. (Boison et al., 2012). Adenosin působící na A_{2A} receptor synaptický přenos usnadňuje dvěma mechanismy. Zmírňuje inhibici prostřednictvím A_1 receptoru (Lopes et al., 2002) a zvyšuje uvolňování neurotransmiteru (Dixon et al., 1996).

Aktivace receptoru A_1 nebo A_{2A} má opačné účinky a zároveň se oba receptory vyskytují na synapsích. Proto je třeba objasnit, jak si adenosin vybírá, který receptor bude preferenčně aktivovat. Zdá se, že záleží na původu adenosinu. Adenosin uvolněný z buňky jako takový nukleosidovými transportéry aktivuje přednostně A_1 receptory, kdežto adenosin vytvořený extracelulárně působí na A_{2A} receptory (Cunha et al., 1996b). To může souviset s lokalizací jednotlivých receptorů, transportérů a enzymů extracelulárního metabolismu adenosinu (CD39 a CD73). Který receptor bude aktivován, tedy závisí na způsobu stimulace, neboť vysoké frekvence vedou k uvolnění ATP a tedy tvorby adenosinu extracelulárně, ale při nízkých frekvencích je adenosin pouze uvolňován (Cunha et al., 1996a). Mechanismus tvorby a uvolnění adenosinu se, stejně jako rozmístění jednotlivých subtypů jeho receptorů, liší v různých oblastech mozku (Pajski and Venton, 2013).

6.4. Imunomodulace

Stejně jako u jiných buněk i v buňkách imunitního systému má adenosinová signalizace velký význam. Uplatňuje se především v patologiích spojených s hypoxií, jako jsou zánět, ischémie nebo rakovina. Avšak nejen adenosin, ale také jemu předcházející (ATP, ADP a AMP) a po něm následující metabolity (inosin a kyselina močová) signalizují v imunitním systému.

Signalizace extracelulárním ATP způsobuje vyvolání prozánětlivé imunitní odpovědi. Odpověď na signalizaci adenosinem je naopak většinou protizánětlivá. Proto zde hrají velmi důležitou roli enzymy CD39 a CD73, které katalyzují hydrolýzu ATP až na adenosin (Antonioli et al., 2013). Avšak existují i buňky, které umí tuto klasickou cestu extracelulární tvorby

adenosinu obejít. Místo enzymu CD39 používají dva jiné membránové proteiny CD38 a CD203a (Horenstein et al., 2013).

Na hypoxii, ať už způsobené zánětem nebo jiným patologickým jevem, buňky odpovídají produkcí hypoxií indukovaných transkripčních faktorů (HIF), zejména HIF-1 α . Ten se potom mimo jiné váže na promotory enzymů účastnících se produkce adenosinu, CD39 a CD73, a tím zvyšuje jejich expresi (Synnestvedt et al., 2002). Je tak dalším mechanismem, kterým za hypoxie dochází ke zvýšení produkce adenosinu. HIF-1 α také snižuje expresi transportérů ENT1 a ENT2, a tím zpomaluje vychytávání adenosinu a zajišťuje tak jeho déletrvající působení (Eltzschig et al., 2005; Morote-Garcia et al., 2009). Dále také zvyšuje expresi adenosinových receptorů, zejména A_{2B} (Kong et al., 2006).

Jednotlivé receptory vyvolávají díky opačnému efektu na funkci adenylátcyklázy odlišnou odpověď. Signalizace prostřednictvím receptorů A₁ a A₃ vyvolá snížení hladiny cAMP a tím aktivaci imunitních buněk, mimo jiné prostřednictvím NF κ B, což je hlavní transkripční faktor stimulující produkci zánětlivých cytokinů (Yang et al., 2014). Receptory A_{2A} a A_{2B} působí naopak imunosupresivně, což je preferenčně probíhající odpověď za patologických situací.

Je tedy důležité, který receptor bude aktivován. Například neutrofilní granulocyty exprimují všechny čtyři adenosinové receptory. Receptory A₁ a A₃ jsou stimulovány za nízkých koncentrací adenosinu, tedy na počátku aktivace imunitní odpovědi, a způsobují zvýšenou chemotaxi a fagocytózu neutrofilů. V pozdější fázi hladina adenosinu roste, což vede k preferenční aktivaci A_{2A} a A_{2B} receptorů. Tato signalizační dráha způsobuje inhibici extravazace, oxidačního vzplanutí, produkce zánětlivých mediátorů a uvolnění granulí (Barletta et al., 2012).

Aktivace A_{2A} receptorů na T lymfocytech vede k inhibici signalizace přes TCR, ale také ke snížené expresi povrchových molekul CD25 a CD40L, které se uplatňují v aktivaci imunitní odpovědi. Zvýšená je naopak exprese PD-1 a CTLA-4, molekul spojených s negativní regulací (Sevigny et al., 2007). Stimulace tohoto receptoru u T buněk může také vést k jejich anergii, tedy stavu, kdy lymfocyt neodpovídá na stimulaci antigenem (Zarek et al., 2008).

Receptor A₃ má nejvyšší expresi na povrchu žírných buněk. To je právě jeden z případů, kdy adenosin působí jako prozánětlivý mediátor. Signalizace tímto receptorem, ale také

receptorem A_{2B} , způsobuje degranulaci mastocytů (Feoktistov et al., 2003; Zhong et al., 2003). Receptor A_3 se však vyskytuje i na dalších buňkách a může například způsobit zvýšenou aktivitu NK buněk a zvýšenou produkci prozánětlivého cytokinu IL-12 (Harish et al., 2003).

U B lymfocytů je adenosinová signalizace nutná pro indukci izotypového přesmyku, tedy procesu, který je nutný pro produkci protilátek jiného izotypu než původní IgM a IgD (Schena et al., 2013).

Na regulaci imunitní odpovědi pomocí adenosinu se mimo buňky imunitního systému podílí i další. Důležitou roli má endotel, který při zánětu umožňuje adhezi leukocytů a jejich migraci do poškozeného místa. Signalizace adenosinem přes A_{2A} receptor však inhibuje produkci adhezivních molekul, prozánětlivých cytokinů i IFN γ , který slouží jako chemotaktická molekula (Bouma et al., 1996).

7. Role adenosinu v patologických procesech

Ovlivněním imunitního systému i dalšími účinky působí adenosin v těle v řadě patologií. Může účinkovat protektivně nebo naopak danou nemoc zhoršovat. V obou případech může terapie zaměřená na aktivaci nebo blokaci jeho účinku pomoci při léčbě.

Samotný adenosin je pro své negativně chronotropní působení v srdci používán jako lék při paroxysmální supraventrikulární tachykardii (Müller and Jacobson, 2011).

Poruchy metabolismu adenosinu mohou mít závažné důsledky. Například deficit adenosindeaminázy je příčinou jedné z těžkých kombinovaných imunodeficiencí (SCID) (Kumar, 2013).

7.1. Ischémie

Ischémie je místní nedokrvení určité tkáně nebo orgánu v důsledku ucpání přívodné tepny. Jejím hlavním následkem je hypoxie, tedy nedostatek kyslíku, ale také nedostatek dalších živin a energie. Nejen samotná ischémie, ale také následné obnovení průtoku krve (reperfúze) způsobuje poškození tkáně. Dohromady se pak následek tohoto stavu nazývá ischemicko-reperfúzní poškození. Může se vyskytovat v různých tkáních lidského těla, ale nejzávažnější je ischémie mozku a ischemická choroba srdeční.

V mozku dochází při ischemii k masivnímu výlevu excitačních neurotransmiterů, hlavně glutamátu. Jejich excitotoxicita je základní příčinou smrti neuronů. Signalizace adenosinovým receptorem A_1 pak působí neuroprotektivně snížením presynaptického uvolňování neurotransmiterů a hyperpolarizací postsynaptické membrány. Aktivace receptoru A_{2A} vede naopak k většímu poškození. K terapeutickému využití při mozkové ischemii se tedy hodí agonisté adenosinového receptoru A_1 a antagonisté A_{2A} (Fredholm et al., 2005).

Reperfuční poškození je pak způsobeno především zánětlivou odpovědí imunitního systému a zvýšenou produkcí kyslíkových radikálů. V tomto případě pak působí adenosin přes A_{2A} receptory protektivně, neboť imunitní systém potlačuje (Kumar, 2013).

Kardioprotektivní účinky při ischemii zprostředkovávají všechny čtyři adenosinové receptory, ale liší se načasováním působení. Signalizace přes A_1 receptor je protektivní při jeho stimulaci před ischemií (Lankford et al., 2006). Jeho role v ochraně proti reperfučnímu poškození je menší a je pro ni nezbytná i stimulace A_{2A} a A_{2B} receptorů (Zhan et al., 2011). Ale právě při reperfúzi dochází k největšímu poškození srdce, a to hlavně působením neutrofilů. Zde se významně uplatňuje receptor A_{2A} , které tlumí jejich činnost (Patel et al., 2009). Naopak působení tohoto receptoru při ischemii se neukázalo být protektivní. Receptor A_{2B} spolupracuje s receptorem A_{2A} při ochraně proti reperfučnímu poškození (Xi et al., 2009). Signalizace A_3 receptorem je protektivní při ischemii (Tracey, 1997), ale i při reperfúzi (Ge et al., 2010). Dalším mechanismem, kterým tento receptor snižuje ischemicko-reperfuční poškození, je jeho zapojení v mechanismu inhibice kaspázy-3, čímž působí proti apoptóze (Hussain et al., 2014).

7.2. Poruchy CNS

7.2.1. Parkinsonova choroba

Parkinsonova nemoc je způsobena odumíráním dopaminergních neuronů v oblasti *substantia nigra*. Nedostatek neurotransmiteru dopaminu pak vede k snížené schopnosti pacientů ovládat motorickou aktivitu. Nejčastěji zde používaným lékem je prekurzor dopaminu levodopa (L-DOPA), který je z těla transportován do mozku a tam přeměněn na dopamin. Dlouhodobým užíváním tohoto léku se u pacientů projevuje jako vedlejší účinek dyskineze (mimovolní pohyby) (Bastide et al., 2014). I proto je snaha vyvinout další léčiva.

Adenosinové A_{2A} receptory a dopaminergní D_2 receptory v mozku fungují antagonisticky. K tomu dochází jednak na úrovni samotných receptorů, které tvoří heterodimery (Fredholm et al., 2011a), ale také v intracelulární signalizaci. Inhibice jednoho receptoru pak vede ke zvýšení signalizace tím druhým a naopak. Proto snížená stimulace D_2 receptoru vede ke zvýšení signalizace adenosinovým receptorem. Tato nerovnováha způsobuje typické hypokinetické projevy Parkinsonovy nemoci. Inhibice A_{2A} receptorů je proto vhodným terčem pro vývoj léků, neboť zlepšuje dopaminergní signalizaci. Tento fakt dokazuje už pozorování, že konzumace antagonisty adenosinových receptorů kofeinu snižuje riziko Parkinsonovy nemoci (Ascherio et al., 2001). Jako lék na Parkinsonovu chorobu je klinicky testován selektivní antagonist A_{2A} receptoru istradefyllin (KW-6002). Bylo ukázáno, že snižuje projevy této nemoci a zároveň tlumí dyskinezi způsobenou levodopou (Mizuno and Kondo, 2013).

7.2.2. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je definována dvěma typickými patologickými znaky – tvorbou extracelulárních amyloidních plaků a intracelulárních neurofibrilárních smotků (tangles). Neurofibrilární smotky jsou tvořeny hyperfosforylovaným τ -proteinem, který za normálních podmínek slouží ke stabilizaci mikrotubulů. Základem amyloidních plaků je β -amyloid, který vzniká nesprávným odbouráváním amyloidního prekursorového proteinu (APP). Za normálních podmínek je APP štěpen převážně α -sekretázou na dále odbouratelné fragmenty. Za patologických podmínek je však štěpen β - a γ -sekretázou na delší fragmenty, které následně polymerují v β -amyloid tvořící plaky. Nahromaděné plaky pak tlačí na tkáň mozku, což způsobuje odumírání neuronů.

Stejně jako u Parkinsonovy choroby se protektivní ukázala konzumace kofeinu. Jeho antagonistické působení na A_{2A} receptory snižuje činnost β -sekretázy (Arendash et al., 2006) a tak působí proti zhoršení paměti a neurodegeneraci (Espinosa et al., 2013). Nedávno bylo ukázáno, že stimulace A_{2A} receptoru zvyšuje vedle činnosti β -sekretázy i činnost γ -sekretázy (Nagpure and Bian, 2014). Při Alzheimerově chorobě je v mozku zvýšená nejen exprese receptorů A_{2A} , ale i A_1 (Albasanz et al., 2008). Aktivace těchto receptorů vede ke zvýšení produkce rozpustného APP stimulací α -sekretázy, ale také aktivuje fosforylaci τ -proteinu (Angulo et al., 2003). Adenosinové receptory v mozku jsou tedy vhodným terapeutickým cílem pro léčbu Alzheimerovy choroby, ale prozatím nejsou testovány.

7.2.3. Epilepsie

Epileptické záchvaty jsou způsobeny abnormální aktivací skupiny neuronů. Konkrétní projevy pak závisí na množství a umístění těchto neuronů. Epileptogeneze může být spuštěna různými mechanismy poškození mozku jako traumatické poranění mozku nebo mozková mrtvice. Následkem těchto poškození dochází ke ztrátě neuronů a to hlavně inhibičních GABAergních interneuronů. Nedostatek inhibičních synapsí pak vede ke zvýšené excitabilitě dalších neuronů. Odumřelé neurony jsou nahrazeny astrocyty a vzniká zde gliová jizva. Toto zmnožení astrocytů neboli astroglíóza je typickým znakem epilepsie (Boison, 2008).

Astrocyty kontrolují hladinu extracelulárního adenosinu a to především jeho fosforylací adenosinkinázou (AK). Zmnožení astrocytů pak vede ke zvýšené expresi AK (Aronica et al., 2011) a tím ke snížení koncentrace adenosinu. Samotná zvýšená exprese AK stačí ke spuštění epileptických záchvatů (Theofilas et al., 2011). Těsně před ukončením záchvatu naopak hladina adenosinu roste, což může znamenat, že je za ukončení zodpovědný (Van Gompel et al., 2014).

Nedostatek adenosinu také působí prostřednictvím S-adenosyl-L-homocysteinu (SAH) na změnu epigenetické informace. Za normálních podmínek SAH inhibuje transmethylaci, což mimo jiné zahrnuje i metylaci DNA a histonů. Nedostatek adenosinu pak vede k nedostatku SAH a DNA je hypermethylována (Williams-Karnesky et al., 2013).

V terapii epilepsie účinkuje samotný adenosin jako antikonvulzivum, tedy látka pro léčbu epileptických záchvatů. Prostřednictvím A_1 receptorů snižuje excitabilitu neuronů (Li et al., 2013). Protože však adenosin má i řadu dalších účinků (např. na srdce), jako lepší se v léčbě epilepsie jeví využití například A_1 agonistů nebo inhibitorů AK.

7.3. Rakovina

Rakovina vzniká nekontrolovatelným zmnožením některé buněčné populace. Je to chronická choroba, která může být v některých fázích asociována se zánětem. Nedostatek kyslíku v nádoru a zánětlivé procesy vedou ke zvýšené produkci adenosinu. Ten se pak prostřednictvím receptorů, ale i jinými cestami, podílí na regulaci nádoru. Zda budou jeho účinky protinádorové či pronádorové závisí na zapojení určité signální dráhy, ale i na konkrétní linii nádorových buněk. Aktivace stejného adenosinového receptoru u stejného

druhu nádoru, ale pouze u jiné buněčné linie může mít až opačný účinek (Sakowicz-Burkiewicz et al., 2013).

Nejdůležitější a obecný účinek adenosinu v růstu nádoru je jeho imunosupresivní funkce zprostředkovaná především A_{2A} receptory. Působí na buňky specifické i nespecifické imunity a potlačuje jejich funkci. Další pro nádor důležitý důsledek signalizace tímto receptorem je indukce angiogeneze (Montesinos et al., 2002), která je nutná pro výživu nádoru i jeho schopnost metastazovat. Aktivace receptoru A_{2A} je tedy nezbytná pro růst nádoru a blokace tohoto receptoru jeho růst inhibuje (Mediavilla-Varela et al., 2013). Stejný účinek má i blokace receptoru A_{2B} (Wei et al., 2013).

Aktivace A_3 receptorů má naopak převážně protinádorové účinky. Signalizace prostřednictvím tohoto receptoru vede k aktivaci kaspáz a tím indukci apoptózy (Nagaya et al., 2013; Otsuki et al., 2012). Adenosin však aktivuje také apoptózu nezávislou na kaspázách, která je způsobena přenosem proteinu AMID (AIF (apoptózu indukující faktor)homologní induktor smrti asociovaný s mitochondrií) z cytosolu do jádra (Tsuchiya et al., 2012). Vedle apoptózy potlačuje adenosin růst nádoru i jinak. Například urychluje stárnutí rakovinných buněk (Yang et al., 2013) nebo snižuje metylaci hypermethylovaných tumor supresorových genů, a tím je aktivuje (Lubecka-Pietruszewska et al., 2014).

8. Závěr

Adenosin, stejně jako jeho receptory, je přítomný prakticky ve všech tkáních lidského těla, kde má řadu fyziologických účinků. Pochopení mechanismů zapojených při jeho vzniku a transportu a také porozumění funkci a regulaci jednotlivých signálních drah účastnících se při přenosu informace zprostředkované adenosinem je důležité pro efektivní vývoj nových léčiv, která by mohla žádoucím způsobem modulovat funkci tohoto složitého buněčného systému.

Adenosin, agonisté i antagonisté jeho receptorů i inhibitory enzymů účastnících se jeho metabolismu se jeví jako vhodné terapeutické cíle v mnoha patologiích. Toto všeobecné využití adenosinového systému je však také jeho nevýhodou. Při terapii jedné patologie je totiž kromě ní ovlivněna i celá řada dalších systémů v našem těle. Proto je třeba vyvinout takové terapie využívající adenosinu, které budou mít pouze lokální působení.

9. Seznam použité literatury

Albasanz, J.L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I., and Martín, M. (2008). Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 18, 211–219.

Angulo, E., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E.I., Viñals, F., Ferrer, I., Lluís, C., and Franco, R. (2003). A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol.* 13, 440–451.

Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., and Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* 19, 355–367.

Arendash, G.W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E.K., Zacharia, L.C., Cracchiolo, J.R., Shippy, D., and Tan, J. (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142, 941–952.

Aronica, E., Zurolo, E., Iyer, A., de Groot, M., Anink, J., Carbonell, C., van Vliet, E.A., Baayen, J.C., Boison, D., and Gorter, J.A. (2011). Upregulation of adenosine kinase in astrocytes in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52, 1645–1655.

Ascherio, A., Zhang, S.M., Hernan, M.A., Kawachi, I., Colditz, G.A., Speizer, F.E., and Willett, W.C. (2001). Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann. Neurol.* 50, 56–63.

Aymerich, I., Fougère, F., Ferré, P., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2006). Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *J. Cell Sci.* 119, 1612–1621.

Baker, J. (2005). Adenosine A1-receptor stimulation leads to both Gi-mediated inhibition and Gs-mediated activation of CRE-mediated gene transcription. *FASEB J.* 19, A1104–A1104.

Baldwin, S. a, Yao, S.Y.M., Hyde, R.J., Ng, A.M.L., Foppolo, S., Barnes, K., Ritzel, M.W.L., Cass, C.E., and Young, J.D. (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 280, 15880–15887.

Barletta, K.E., Ley, K., Mehrad, B., and Barletta, K.E.; Ley, K.; Mehrad, B. (2012). Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 856–864.

Barnes, K., Dobrzynski, H., Foppolo, S., Beal, P.R., Ismat, F., Scullion, E.R., Sun, L., Tellez, J., Ritzel, M.W.L., Claycomb, W.C., et al. (2006). Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ. Res.* 99, 510–519.

Barsotti, C., and Ipata, P.L. (2004). Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2214–2225.

Bastide, M.F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C.E., Fernagut, P.-O., and Bézard, E. (2014). Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol. Dis.* 62, 179–192.

Boison, D. (2008). The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. *Prog. Neurobiol.* 84, 249–262.

Boison, D., Chen, J.-F., and Fredholm, B.B. (2010). Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ.* 17, 1071–1082.

Boison, D., Singer, P., Shen, H.-Y., Feldon, J., and Yee, B.K. (2012). Adenosine hypothesis of schizophrenia--opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology* 62, 1527–1543.

Bouma, M., VandenWildenberg, F., and Buurman, W. (1996). Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 270, C522–C529.

Brundage, J.M., Diao, L., Proctor, W.R., and Dunwiddie, T. V. (1997). The Role of Cyclic AMP as a Precursor of Extracellular Adenosine in the Rat Hippocampus. *Neuropharmacology* 36, 1201–1210.

Cordeaux, Y., Ijzerman, A.P., and Hill, S.J. (2004). Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for agonist-specific G protein activation. *Br. J. Pharmacol.* 143, 705–714.

Corvol, J.C., Studler, J.M., Schonn, J.S., Girault, J.A., and Hervé, D. (2001). G α olf is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J. Neurochem.* 76, 1585–1588.

Cunha, R., Vizi, E., Ribeiro, J., and Sebastiao, A. (1996a). Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 67, 2180–2187.

Cunha, R.A., Correia-de-Sá, P., Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (1996b). Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 119, 253–260.

Decking, U.K.M., Schlieper, G., Kroll, K., and Schrader, J. (1997). Hypoxia-Induced Inhibition of Adenosine Kinase Potentiates Cardiac Adenosine Release. *Circ. Res.* 81, 154–164.

Deussen, A., Bading, B., Kelm, M., and Schrader, J. (1993). Formation and salvage of adenosine by macrovascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 264, H692–700.

Deussen, A., Stappert, M., Schafer, S., and Kelm, M. (1999). Quantification of Extracellular and Intracellular Adenosine Production: Understanding the Transmembranous Concentration Gradient. *Circulation* 99, 2041–2047.

- Dixon, A.K., Gubitz, A.K., Sirinathsinghji, D.J., Richardson, P.J., and Freeman, T.C. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1461–1468.
- Eltzschig, H.K., Abdulla, P., Hoffman, E., Hamilton, K.E., Daniels, D., Schönfeld, C., Löffler, M., Reyes, G., Duszenko, M., Karhausen, J., et al. (2005). HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J. Exp. Med.* **202**, 1493–1505.
- Engel, K., Zhou, M., and Wang, J. (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J. Biol. Chem.* **279**, 50042–50049.
- Erlichman, J.S., Leiter, J.C., and Gourine, A. V (2010). ATP, glia and central respiratory control. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **173**, 305–311.
- Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2009). A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* **23**, 172–182.
- Espinosa, J., Rocha, A., Nunes, F., Costa, M.S., Schein, V., Kazlauckas, V., Kalinine, E., Souza, D.O., Cunha, R.A., and Porciúncula, L.O. (2013). Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J. Alzheimers. Dis.* **34**, 509–518.
- Feoktistov, I., Ryzhov, S., Goldstein, A.E., and Biaggioni, I. (2003). Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ. Res.* **92**, 485–492.
- Fredholm, B.B., Irenius, E., Kull, B., and Schulte, G. (2001). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 443–448.
- Fredholm, B.B., Chen, J.-F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J.-M. (2005). Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* **63**, 191–270.
- Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Müller, C.E. (2011a). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol. Rev.* **63**, 1–34.
- Fredholm, B.B., Johansson, S., and Wang, Y.-Q. (2011b). Adenosine and the regulation of metabolism and body temperature. *Adv. Pharmacol.* **61**, 77–94.
- Gass, N., Porkka-Heiskanen, T., and Kalinchuk, A. V (2009). The role of the basal forebrain adenosine receptors in sleep homeostasis. *Neuroreport* **20**, 1013–1018.
- Ge, Z.-D., van der Hoeven, D., Maas, J.E., Wan, T.C., and Auchampach, J.A. (2010). A(3) adenosine receptor activation during reperfusion reduces infarct size through actions on bone marrow-derived cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 280–286.

- Van Gompel, J.J., Bower, M.R., Worrell, G.A., Stead, M., Chang, S.-Y., Goerss, S.J., Kim, I., Bennet, K.E., Meyer, F.B., Marsh, W.R., et al. (2014). Increased cortical extracellular adenosine correlates with seizure termination. *Epilepsia* 55, 233–244.
- Gourine, A. V, Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571–575.
- Govindarajan, R., Leung, G.P.H., Zhou, M., Tse, C.-M., Wang, J., and Unadkat, J.D. (2009). Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G910–22.
- Gray, J.H., Owen, R.P., and Giacomini, K.M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* 447, 728–734.
- Griffiths, M., Yao, S.Y., Abidi, F., Phillips, S.E., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S.A. (1997). Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem. J.* 328 (Pt 3, 739–743.
- Hamilton, S.R., Yao, S.Y., Ingram, J.C., Hadden, D. a, Ritzel, M.W., Gallagher, M.P., Henderson, P.J., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S. a (2001). Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J. Biol. Chem.* 276, 27981–27988.
- Harish, A., Hohana, G., Fishman, P., Arnon, O., and Bar-Yehuda, S. (2003). A3 adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *Int. J. Oncol.* 23, 1245–1249.
- Hawkins, C.F., Kyd, J.M., and Bagnara, A.S. (1980). Adenosine metabolism in human erythrocytes: A study of some factors which affect the metabolic fate of adenosine in intact red cells in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 202, 380–387.
- Headrick, J.P., Ashton, K.J., Rose'meyer, R.B., and Peart, J.N. (2013). Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol. Ther.* 140, 92–111.
- Hillaire-Buys, D., Bertrand, G., Gross, R., and Loubatières-Mariani, M.-M. (1987). Evidence for an inhibitory A1 subtype adenosine receptor on pancreatic insulin-secreting cells. *Eur. J. Pharmacol.* 136, 109–112.
- Horenstein, A.L., Chillemi, A., Zaccarello, G., Bruzzone, S., Quarona, V., Zito, A., Serra, S., and Malavasi, F. (2013). A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology* 2, e26246.
- Huang, Z.-L., Qu, W.-M., Eguchi, N., Chen, J.-F., Schwarzschild, M.A., Fredholm, B.B., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2005). Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat. Neurosci.* 8, 858–859.

Hussain, A., Gharanej, A.M., Nagra, A.S., and Maddock, H.L. (2014). Caspase inhibition via A3 adenosine receptors: a new cardioprotective mechanism against myocardial infarction. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 28, 19–32.

Johansson, S.M., Lindgren, E., Yang, J.-N., Herling, A.W., and Fredholm, B.B. (2008). Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue-interactions with insulin. *Eur. J. Pharmacol.* 597, 92–101.

Kalinchuk, A. V, Lu, Y., Stenberg, D., Rosenberg, P.A., and Porkka-Heiskanen, T. (2006). Nitric oxide production in the basal forebrain is required for recovery sleep. *J. Neurochem.* 99, 483–498.

Kalinchuk, A. V, McCarley, R.W., Porkka-Heiskanen, T., and Basheer, R. (2011). The time course of adenosine, nitric oxide (NO) and inducible NO synthase changes in the brain with sleep loss and their role in the non-rapid eye movement sleep homeostatic cascade. *J. Neurochem.* 116, 260–272.

Kiss, a, Farah, K., Kim, J., Garriock, R.J., Drysdale, T. a, Hammond, J.R., A, K., K, F., J, K., R, G., et al. (2000). Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem. J.* 352 Pt 2, 363–372.

Koczor, C.A., Torres, R.A., and Lewis, W. (2012). The role of transporters in the toxicity of nucleoside and nucleotide analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8, 665–676.

Kong, T., Westerman, K.A., Faigle, M., Eltzschig, H.K., and Colgan, S.P. (2006). HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J.* 20, 2242–2250.

Koupenova, M., and Ravid, K. (2013). Adenosine, adenosine receptors and their role in glucose homeostasis and lipid metabolism. *J. Cell. Physiol.*

Krieg, T., Qin, Q., McIntosh, E.C., Cohen, M. V, and Downey, J.M. (2002). ACh and adenosine activate PI3-kinase in rabbit hearts through transactivation of receptor tyrosine kinases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H2322–30.

Kroll, K., Decking, U.K., Dreikorn, K., and Schrader, J. (1993). Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ. Res.* 73, 846–856.

Kull, B.J., Svenningsson, P.E.R., and Fredholm, B.B. (2000). Adenosine A 2A Receptors are Colocalized with and Activate G olf in Rat Striatum. *Mol. Pharmacol.* 58, 771–777.

Kumar, V. (2013). Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal.* 9, 145–165.

Lankford, A.R., Yang, J.-N., Rose'Meyer, R., French, B.A., Matherne, G.P., Fredholm, B.B., and Yang, Z. (2006). Effect of modulating cardiac A1 adenosine receptor expression on protection with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1469–73.

Li, M., Kang, R., Shi, J., Liu, G., and Zhang, J. (2013). Anticonvulsant activity of B2, an adenosine analog, on chemical convulsant-induced seizures. *PLoS One* 8, e67060.

Linden, J., Thai, T., Figler, H., Jin, X., and Robeva, A.S. (1999). Characterization of Human A2B Adenosine Receptors: Radioligand Binding, Western Blotting, and Coupling to Gq in Human Embryonic Kidney 293 Cells and HMC-1 Mast Cells. *Mol. Pharmacol.* 56, 705–713.

Lloyd, H. (1995). Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochem. Int.* 26, 387–395.

Loncar, R., Flesche, C.W., and Deussen, A. (1997). Determinants of the S-adenosylhomocysteine (SAH) technique for the local assessment of cardiac free cytosolic adenosine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 1289–1305.

Lopes, L.V., Cunha, R.A., Kull, B., Fredholm, B.B., and Ribeiro, J.A. (2002). Adenosine A2A receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A1 receptor inhibition. *Neuroscience* 112, 319–329.

Lubecka-Pietruszewska, K., Kaufman-Szymczyk, A., Stefanska, B., Cebula-Obrzut, B., Smolewski, P., and Fabianowska-Majewska, K. (2014). Clofarabine, a novel adenosine analogue, reactivates DNA methylation-silenced tumour suppressor genes and inhibits cell growth in breast cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 723, 276–287.

Maldonado, C., Pushpakumar, S.B., Perez-Abadia, G., Arumugam, S., and Lane, A.N. (2013). Administration of exogenous adenosine triphosphate to ischemic skeletal muscle induces an energy-sparing effect: role of adenosine receptors. *J. Surg. Res.* 181, e15–22.

Mediavilla-Varela, M., Luddy, K., Noyes, D., Khalil, F.K., Neuger, A.M., Soliman, H., and Antonia, S.J. (2013). Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth. *Cancer Biol. Ther.* 14, 860–868.

Mizuno, Y., and Kondo, T. (2013). Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline reduces daily OFF time in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28, 1138–1141.

Molina-Arcas, M., Trigueros-Motos, L., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2008). Physiological and pharmacological roles of nucleoside transporter proteins. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 27, 769–778.

Montesinos, M.C., Desai, A., Chen, J.-F., Yee, H., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S., and Cronstein, B.N. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *Am. J. Pathol.* 160, 2009–2018.

Morote-Garcia, J.C., Rosenberger, P., Nivillac, N.M.I., Coe, I.R., and Eltzschig, H.K. (2009). Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *Gastroenterology* 136, 607–618.

Müller, C.E., and Jacobson, K.A. (2011). Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1290–1308.

Nagaya, H., Gotoh, A., Kanno, T., and Nishizaki, T. (2013). A3 adenosine receptor mediates apoptosis in in vitro RCC4-VHL human renal cancer cells by up-regulating AMID expression. *J. Urol.* 189, 321–328.

Nagpure, B.V., and Bian, J.-S. (2014). Hydrogen sulfide inhibits A2A adenosine receptor agonist induced β -amyloid production in SH-SY5Y neuroblastoma cells via a cAMP dependent pathway. *PLoS One* 9, e88508.

Otsuki, T., Kanno, T., Fujita, Y., Tabata, C., Fukuoka, K., Nakano, T., Gotoh, A., and Nishizaki, T. (2012). A3 adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 30, 210–220.

Pajski, M.L., and Venton, B.J. (2013). The mechanism of electrically stimulated adenosine release varies by brain region. *Purinergic Signal.* 9, 167–174.

Pastor-Anglada, M., Cano-soldado, P., Errasti-murugarren, E., and Casado, F.J. (2008). SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins.

Patel, R.A.G., Glover, D.K., Broisat, A., Kabul, H.K., Ruiz, M., Goodman, N.C., Kramer, C.M., Meerdink, D.J., Linden, J., and Beller, G.A. (2009). Reduction in myocardial infarct size at 48 hours after brief intravenous infusion of ATL-146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H637–42.

Petrack, B., Czernik, A.J., Ansell, J., and Cassidy, J. (1981). Potentiation of arginine-induced glucagon secretion by adenosine. *Life Sci.* 28, 2611–2615.

Podgorska, M., Kocbuch, K., and Pawelczyk, T. (2005). Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim. Pol.* 52, 749–758.

Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R., and McCarley, R. (2000). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 99, 507–517.

Rittiner, J.E., Korboukh, I., Hull-Ryde, E.A., Jin, J., Janzen, W.P., Frye, S. V, and Zylka, M.J. (2012). AMP is an adenosine A1 receptor agonist. *J. Biol. Chem.* 287, 5301–5309.

Rose, J.B., and Coe, I.R. (2008). Physiology of nucleoside transporters: Back to the future. *Physiology* 23, 41–48.

Sachdeva, S., and Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* 21, 245–253.

Sakowicz-Burkiewicz, M., Kitowska, A., Grden, M., Maciejewska, I., Szutowicz, A., and Pawelczyk, T. (2013). Differential effect of adenosine receptors on growth of human colon cancer HCT 116 and HT-29 cell lines. *Arch. Biochem. Biophys.* 533, 47–54.

Sevigny, C.P., Li, L., Awad, A.S., Huang, L., McDuffie, M., Linden, J., Lobo, P.I., and Okusa, M.D. (2007). Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J. Immunol.* 178, 4240–4249.

Schena, F., Volpi, S., Faliti, C.E., Penco, F., Santi, S., Proietti, M., Schenk, U., Damonte, G., Salis, A., Bellotti, M., et al. (2013). Dependence of immunoglobulin class switch recombination in B cells on vesicular release of ATP and CD73 ectonucleotidase activity. *Cell Rep.* 3, 1824–1831.

Schulte, G., and Fredholm, B.B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* 15, 813–827.

Sichardt, K., and Nieber, K. (2007). Adenosine A(1) receptor: Functional receptor-receptor interactions in the brain. *Purinergic Signal.* 3, 285–298.

Smith, K.M., Ng, A.M.L., Yao, S.Y.M., Labeledz, K.A., Knaus, E.E., Wiebe, L.I., Cass, C.E., Baldwin, S.A., Chen, X.-Z., Karpinski, E., et al. (2004). Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 558, 807–823.

Smith, K.M., Slugoski, M.D., Loewen, S.K., Ng, A.M.L., Yao, S.Y.M., Chen, X.-Z., Karpinski, E., Cass, C.E., Baldwin, S. a, and Young, J.D. (2005). The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J. Biol. Chem.* 280, 25436–25449.

Smith, K.M., Slugoski, M.D., Cass, C.E., Baldwin, S. a, Karpinski, E., and Young, J.D. (2007). Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Mol. Membr. Biol.* 24, 53–64.

Snyder, F.F., and Lukey, T. (1982). Kinetic considerations for the regulation of adenosine and deoxyadenosine metabolism in mouse and human tissues based on a thymocyte model. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 696, 299–307.

Suárez, J., and de Sánchez, V.C. (1997). Inhibition of S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase by adrenaline in isolated Guinea-pig papillary muscles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1279–1284.

Sundaram, M., Yao, S.Y., Ingram, J.C., Berry, Z.A., Abidi, F., Cass, C.E., Baldwin, S.A., and Young, J.D. (2001). Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J. Biol. Chem.* 276, 45270–45275.

Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H.K., Hansen, K.R., Thompson, L.F., and Colgan, S.P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation

by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 110, 993–1002.

Theofilas, P., Brar, S., Stewart, K.-A., Shen, H.-Y., Sandau, U.S., Poulsen, D., and Boison, D. (2011). Adenosine kinase as a target for therapeutic antisense strategies in epilepsy. *Epilepsia* 52, 589–601.

Tracey, W. (1997). Selective adenosine A3 receptor stimulation reduces ischemic myocardial injury in the rabbit heart. *Cardiovasc. Res.* 33, 410–415.

Tsuchiya, A., Kanno, T., Saito, M., Miyoshi, Y., Gotoh, A., Nakano, T., and Nishizaki, T. (2012). Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in [corrected] MCF-7 human breast cancer cells by accumulating AMID in the nucleus. *Cancer Lett.* 321, 65–72.

Tu, J., Le, G., and Ballard, H.J. (2010). Involvement of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the acidosis-induced efflux of ATP from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 588, 4563–4578.

Turner, M.A., Yang, X., Yin, D., Kuczera, K., Borchardt, R.T., and Howell, P.L. (2000). Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem. Biophys.* 33, 101–125.

Wang, C., Lin, W., Playa, H., Sun, S., Cameron, K., and Buolamwini, J.K. (2013). Dipyridamole analogs as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4). *Biochem. Pharmacol.* 86, 1531–1540.

Wei, Q., Costanzi, S., Balasubramanian, R., Gao, Z.-G., and Jacobson, K.A. (2013). A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signal.* 9, 271–280.

Williams-Karnesky, R.L., Sandau, U.S., Lusardi, T.A., Lytle, N.K., Farrell, J.M., Pritchard, E.M., Kaplan, D.L., and Boison, D. (2013). Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. *J. Clin. Invest.* 123, 3552–3563.

Xi, J., McIntosh, R., Shen, X., Lee, S., Chanoit, G., Criswell, H., Zvara, D.A., and Xu, Z. (2009). Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 684–690.

Yang, D., Song, J., Wu, L., Ma, Y., Song, C., Dovat, S., Nishizaki, T., and Liu, J. (2013). Induction of senescence by adenosine suppressing the growth of lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 62–67.

Yang, J., Zheng, X., Haugen, F., Darè, E., Lövdahl, C., Schulte, G., Fredholm, B.B., and Valen, G. (2014). Adenosine increases LPS-induced nuclear factor kappa B activation in smooth muscle cells via an intracellular mechanism and modulates it via actions on adenosine receptors. *Acta Physiol. (Oxf).* 210, 590–599.

Yao, S.Y.M., Ng, A.M.L., Cass, C.E., Baldwin, S.A., and Young, J.D. (2011). Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J. Biol. Chem.* **286**, 32552–32562.

Young, J.D., Yao, S.Y.M., Baldwin, J.M., Cass, C.E., and Baldwin, S.A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* **34**, 529–547.

Zarek, P.E., Huang, C.-T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G., and Powell, J.D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **111**, 251–259.

Zhan, E., McIntosh, V.J., and Lasley, R.D. (2011). Adenosine A₂A and A₂B receptors are both required for adenosine A₁ receptor-mediated cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H1183–9.

Zhang, J., Visser, F., King, K.M., Baldwin, S. a, Young, J.D., and Cass, C.E. (2007). The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 85–110.

Zhong, H., Shlykov, S.G., Molina, J.G., Sanborn, B.M., Jacobson, M.A., Tilley, S.L., and Blackburn, M.R. (2003). Activation of Murine Lung Mast Cells by the Adenosine A₃ Receptor. *J. Immunol.* **171**, 338–345.

Zhou, M., Duan, H., Engel, K., Xia, L., and Wang, J. (2010). Adenosine transport by plasma membrane monoamine transporter: reinvestigation and comparison with organic cations. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 1798–1805.

Zywert, A., Szkudelska, K., and Szkudelski, T. (2011). Effects of adenosine A₁ receptor antagonism on insulin secretion from rat pancreatic islets. *Physiol. Res.* **60**, 905–911.